

月山に出現する *Chloromonas nivalis* の接合子壁における翼形状の違いとその系統分類学的意義

松崎 令¹・設楽智文²・野崎久義³・原慶明¹

1：山形大学理学部生物学科 2：山形大学理工学研究科生物学専攻

3：東京大学大学院理学研究科生物科学専攻

はじめに

月山など日本の豪雪地帯では初夏の雪解け時期に残雪の表面からその内部にかけて、色づくほど高密度に繁殖する微細藻類に遭遇する。これらの着色部(彩雪：Fukushima 1963)に優占する藻類を雪上藻類あるいは氷雪藻類と呼んでいる。*Chloromonas nivalis* も代表的な雪上藻の1種で、遊泳期は緑色を呈し、不動の接合子はカロテノイドを蓄積するため、赤色を呈する。

C. nivalis は接合子の状態で世界中の彩雪から発見される普遍種で、日本では Fukushima (1963) が日本各地の赤色ないしは赤褐色の彩雪から *Scotiella nivalis* として報告して以来、久しく研究されていなかった。しかし最近、Muramoto *et al.* (2008) が山形県月山姥ヶ岳山麓にある県立自然博物園内のブナ林周辺の赤色彩雪から *C. nivalis* の接合子を採集し、接合子壁の表面に、直線状とS字状の2型の翼が発達することを指摘し、それらの *rbcl* 遺伝子に基づく分子系統解析を行った。彼らによると翼の形状との対応関係は不明であるが、*rbcl* 遺伝子に2つのハプロタイプが存在し、そのうちの1つは北米産の *C. nivalis* (Hoham *et al.* 2002) と単系統を形成し、他の一つは別の雪上藻類(*Chloromonas* 属藻類)とクレードを形成すると報告した。このことは *C. nivalis* に系統的に異なる分類群、すなわち隠蔽種が存在する可能性があることを指摘した。特に単細胞 PCR 法を用いた分子系統解析を行ったが、光学顕微鏡下で翼形状を識別することが困難なため、隠蔽種と接合子壁の翼形状の関係を解明するには至らなかった。

本研究は彼らの研究に引き続き、高倍率の光学顕微鏡で翼形状を識別した後、単細胞 PCR を行い、各接合子の *rbcl* 配列を決定し、*C. nivalis* の隠蔽種と接合子壁の翼形状との関係について解析した。

材料と方法

2008年5月中旬から6月中旬にかけて、山形県立自然博物園内(図1)のブナ林周辺(図2)に出現していた赤色ないしは赤褐色彩雪を滅菌スプーンで、プラスチック容器(90MB PET-P:東名化学工業株式会社、愛知)に採取し、その容器を氷を詰めた発泡スチロールコンテナに入れ、山形大学理学部生物学科の研究室に持ち帰り、5℃の培養庫に保存した。

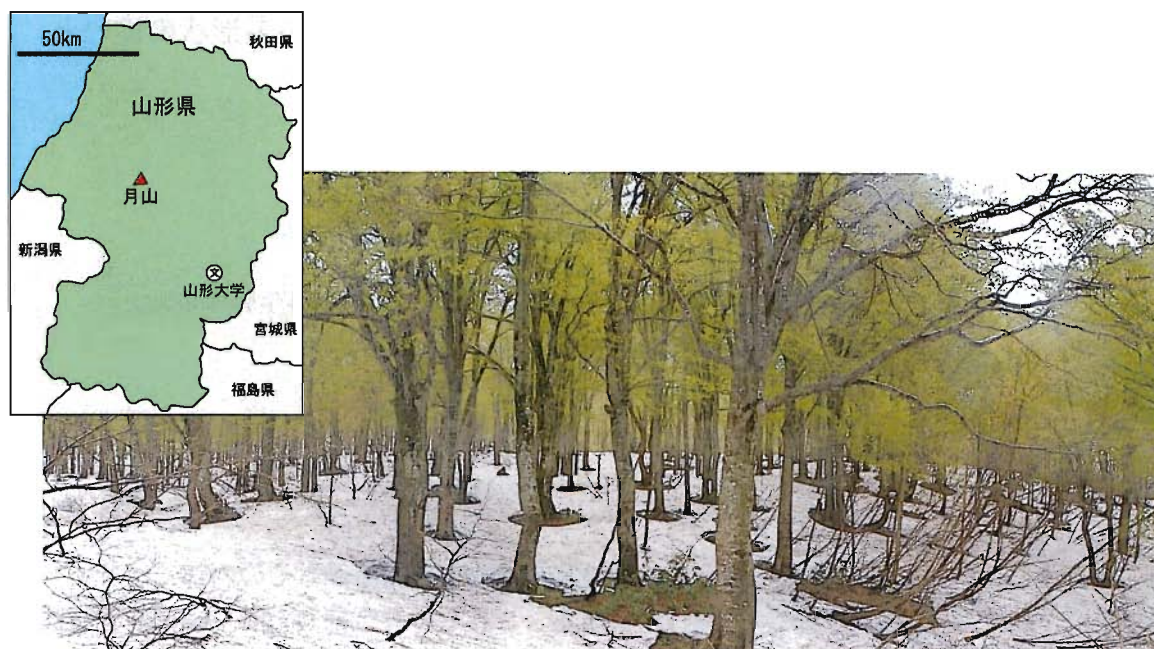


図1－2．月山の位置と採取場所の写真。1：月山と山形大学の位置。2：山形県立自然博物館内のブナ林。

各接合子の翼形状はノマルスキー光学顕微鏡(BX50、オリンパス社、東京)、600～800倍で判別して、以降の実験試料とした。

単細胞 PCR 法は翼形状を判別した接合子を1個ずつ、5μlの滅菌蒸留水とともに0.2ml PCR チューブ (Greiner Bio-One、New York)に入れた。この接合子の入ったチューブを液体窒素と90℃の湯に20秒ずつ交互に3回浸けて、細胞を破碎した。以降の手順はSebastián and O' Ryan (2001)に準拠した。Ampli Taq Gold (Life Technologies Corporation、Carlsbad)を用いた20μlのPCR反応混合液をPCRチューブに加えてPCRを行った。PCRはthermal cycler (GeneAmp PCR System 9700: ABI Applied Biosystems、Foster City)を用いて行い、94℃で15分熱してから、94℃で2分間(変性)・46℃で2分間(アニーリング)・66℃で3分間(伸長)を35回繰り返し、最後に72℃で15分維持した後に4℃で保存した。プライマーは先行研究で使用された雪上藻特異的 *rbdL* 遺伝子プライマーである SNOW-F1(5' -GAATCTTCWACWGGTACTTGGAC-3')と SNOW-R3(5' -ATRAAACGGTCTCTCCAACGCAT-3') (Muramoto *et al.* 2008)を用いた。DNA量が少ないため、PCR終了後すぐにQIAquick PCR purification Kit(Qiagen、Valencia)を用いてPCR産物を精製し、SNOW-F1、SNOW-F2(5' -ACTGATGGTTTAACAAGTCTTGA-3' (Muramoto *et al.* 2008))と、新たに作成した SNOW-R2new(5' -GTCTAASCCACCACGTAAACATTC-3')、SNOW-R4 (5' -CRTAAACAGCACGTCCGTAG-3')を用いて2nd PCRを行った。2nd PCRは25μlのAmpli Taq Gold(Life Technologies Corporation)反応混合液を作成し、94℃で15分熱してから、94℃で30秒(変性)・50℃で

た後に 4℃で保存した。PCR 産物 25μl のうち 5μl を電気泳動にかけて *rbcl* 遺伝子の増幅を確認し、増幅が確認できた PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を BigDye Terminator ver. 1.1 (ABI Applied Biosystems) を用いたサイクル PCR にか、シーケンシングを行って各接合子の *rbcl* 遺伝子配列を決定した。

操作分類群 (OTU) として *Carteria* 8 種、*Pseudocarteria* 1 種、*Chloromonas* 19 種、*Chlainomonas* 2 種の *rbcl* 遺伝子情報を GenBank より引用した。アラインメントには ClustalW (Thompson *et al.* 1994) を使い、OTU の *rbcl* 遺伝子配列 (1,128 塩基, Nozaki *et al.* 2003)、Muramoto *et al.* (2008) により月山で採取された *C. nivalis* の接合子から得た 340 から 400 塩基の *rbcl* 遺伝子部分配列 (Gassan-NIV 1・2)、そして本研究で得た *C. nivalis* 接合子の 309 から 410 塩基の *rbcl* 遺伝子部分配列 (表 1) を系統樹構築に供した。MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) を使い、Kimura の 2 変数法 (Kimura 1980) に基づく近隣結合法系統樹 (Saitou and Nei 1987) を構築し、1,000 回反復のブートストラップによる内部枝検定 (Dopazo 1994) を行った。また、*Carteria* と *Pseudocarteria* を外群として用いた。

表 1. 本研究の *rbcl* 遺伝子配列に基づく系統解析に用いた種類と株名、株保存施設名と GenBank の Accession number 一覧。

分類群	株名または証拠標本名	Accession number
<i>Carteria</i> (<i>Ca.</i>)		
<i>Ca. cerasiformis</i>	NIES ^a -425	D89768
<i>Ca. crucifera</i>	NIES-421	D63431
<i>Ca. eugametos</i>	UTEX ^b 1032	D89760
<i>Ca. inversa</i>	NIES-423	D89766
<i>Ca. obtusa</i>	NIES-428	D89769
<i>Ca. palmata</i>	NIES-1336	AB204869
<i>Ca. radiosa</i>	NIES-432	D89770
<i>Ca. sp.</i>	UTEX 2	EF113417
<i>Pseudocarteria</i> (<i>P.</i>)		
<i>P. mucosa</i>	NIES-522	AB084335
<i>Chloromonas</i> (<i>C.</i>)		
<i>C. actinochloris</i> (' <i>Cd. mutabilis</i> ')	UTEX 578	AB022224
<i>C. asteroidea</i> (' <i>Cd. bipapillata</i> ')	SAG ^c 11-47	AB022225
<i>C. augustae</i>	UTEX 1969	AB022228

— 続 く —

<i>C. brevispina</i>	UTEX SNO132	AB434263
<i>C. chenangoensis</i>	UTEX SNO143	AB434264
<i>C. hohamii</i>	UTEX SNO67	AB434265
<i>C. insignis</i>	NIES-447	AB022226
<i>C. macrostellata</i>	SAG 72. 81	AB022230
<i>C. nivalis</i>	CU563D	AF517078
	UTEX SNO 66	AB434272
	GASSAN-NIV1 ^d	AB434274
	GASSAN-NIV2 ^d	AB434275
	NIV-Straight1 ^d	
	NIV-Straight2 ^d	
	NIV-Straight3 ^d	
	NIV-Straight4 ^d	
	NIV-Straight5 ^d	
	NIV-Sigmate1 ^d	
	NIV-Sigmate2 ^d	
	NIV-Sigmate3 ^d	
	NIV-Sigmate4 ^d	
<i>C. palmelloides</i>	SAG 32. 86	AB022530
<i>C. paraserbinowii</i>	SAG 71. 72	AF517074
<i>C. pichinchae</i>	UTEX SNO 33	AB434266
<i>C. reticulata</i> (' <i>Cd. clathrata</i> ')	UTEX 1970	AB022534
<i>C. radiata</i> (' <i>Cd. radiata</i> ')	UTEX 966	AJ001878
<i>C. rosae</i>	UTEX 1337	AB022536
<i>C. rosae</i> var. <i>psychrophila</i>	UTEX SNO47	AF517073
<i>C. rubrifilum</i> (' <i>C. serbinowii</i> ')	UTEX 492	AJ001879
<i>C. tughillensis</i>	UTEX SNO88	AB434273
<i>C. variabilis</i>	SAG 79. 81	AF517077
<i>Chlainomonas</i> (<i>Ci.</i>)		
<i>Ci. kolii</i>	P. M. Novis	DQ885963
	CHR586425 ^e	
<i>Ci. rubra</i>	P. M. Novis	DQ885969
	CHR586427 ^e	

^a: 国立環境研究所微生物系統保存施設 (Kasai *et al.* 2004)。^b: テキサス大学藻類系統保存施設 (Starr and Zeikus 1993)。^c: ゲッティンゲン大学藻類系統保存施設 (Schlösser 1994)。^d: 月山で採取した接合子の試料。^e: 標本試料。

結果

光学顕微鏡下での *C. nivalis* の接合子の特徴は、Fukushima (1963) の *Scotiella nivalis* の記述と一致した。接合子の大きさは長さ 27.5~37 μ m、幅 12.5~20 μ m の紡錘形で細胞壁に顕著な翼を持ち、その翼の形状は直線型(図3)とS字型(図4)の2型があり、翼の型に関わらず、細胞内部にはオレンジ色の色素が大量に蓄積されていた。細胞中心部にはクロロフィルの緑色が残っている接合子も見られた(図5)。翼の列数は直線型もS字型もともにおよそ8列であった。



図3-5. 光学顕微鏡で観察した *Chloromonas nivalis* の接合子。スケールバーは10 μ m。
図3:直線型の翼を持つ接合子。4:S字型の翼をもつ接合子。5:中心部にクロロフィルの緑色が残る接合子。

光学顕微鏡を用いて翼形状を直線型とS字型に識別した個体(直線型5個体とS字型4個体)から、単細胞PCR法によって、309~410塩基の部分的な *rbcL* 遺伝子配列を得た。この配列を用いて構築した近隣結合法系統樹(図6)では、月山産の *C. nivalis* の接合子は遺伝的に2つのグループに分かれた。どちらのグループもクレードAに位置し、その中でも雪上藻のみで構成されるサブクレードA2 (Hoham *et al.* 2002)に含まれた。低い信頼値ではあるが、ひとつのグループは北米の *C. nivalis* (UTEX SN066, CU563D) と Gassan-NIV 1 (Muramoto *et al.* 2008) とともに単系統を形成し、もうひとつのグループは *C. tughillensis* (Hoham *et al.* 2006)、*C. pichincae* (Wille 1903)、*C. brevispina* (Hoham *et al.* 1979)、そして *C. hohamii* (Ling & Seppelt 1998) の雪上藻4種と、Gassan-NIV 2 (Muramoto *et al.* 2008) とともに1つのクレードを形成した。また、直線型とS字型の翼形状は系統的に別れたグループに関係なく出現した(図6)。

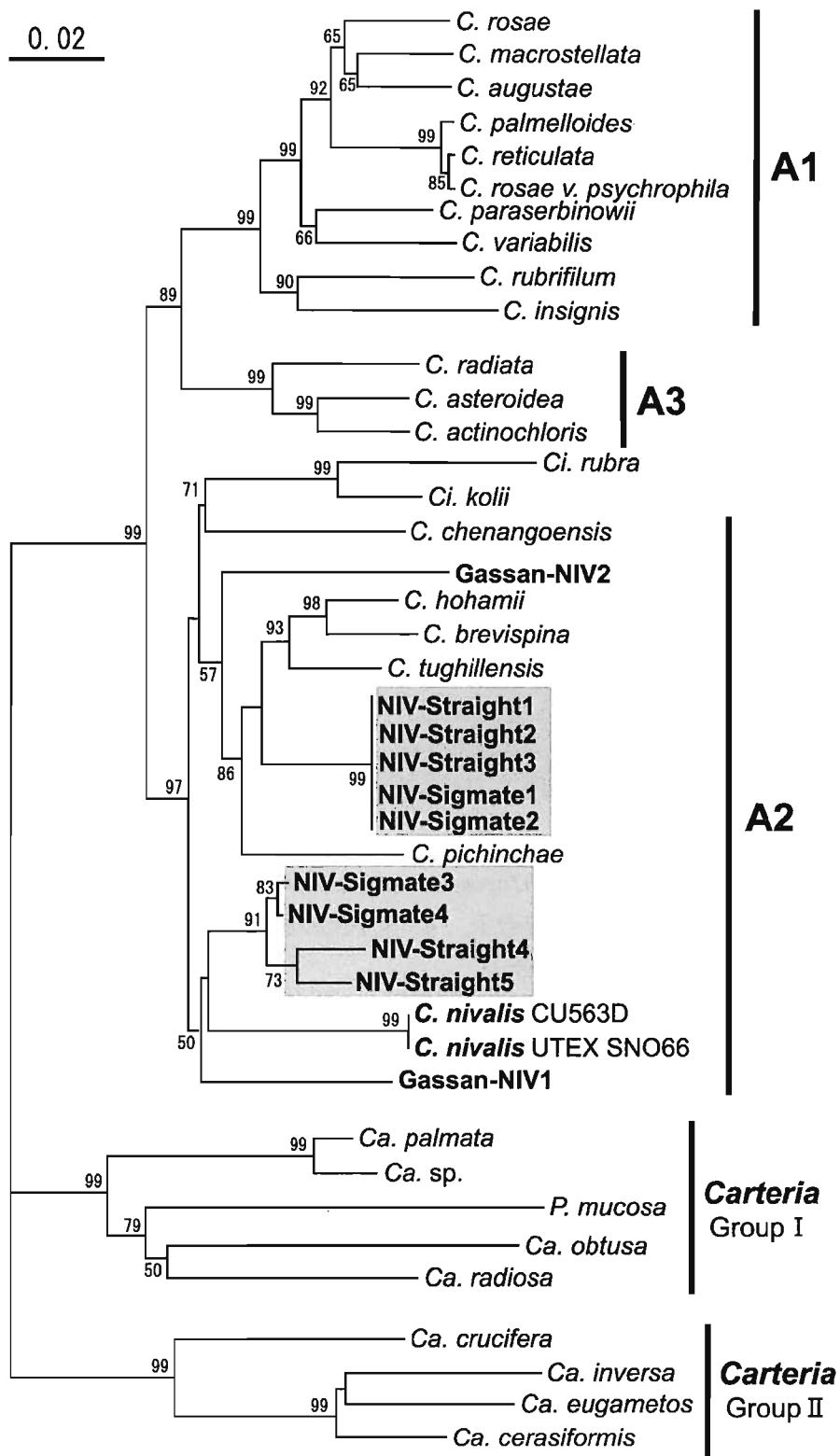


図 6. *rbcL* 遺伝子配列を用いた近隣結合法系統樹。Kimura の 2 変数法に基づき樹形を構築した。数値はブートストラップを用いた内部枝検定による信頼値(>50%)で、A 1、A 2、そして A 3 は Hoham ら (2002) に準拠した。

検討

単細胞 PCR 法により得た *rbcl* 遺伝子の部分配列に基づいて分子系統解析を行った結果、遺伝的に異なる 2 つのグループに別れた。同じように 2 つのハプロタイプの存在を確認した Muramoto ら (2008) は接合子の翼形状を識別せずに分析したため、ハプロタイプと翼形状の関係についてはわからなかったと述べている。本研究では高倍率の光学顕微鏡を用いて各接合子の翼形状を識別してから分子系統解析を行ったが、遺伝的に異なる 2 グループのどちらにも直線型と S 字型の翼形状が混在することがわかった。今回の系統解析に用いた *C. nivalis* の *rbcl* 遺伝子は部分的な配列であり、内部枝検定の信頼値も低い、構築された樹形は *rbcl* 遺伝子を用いて雪上藻の系統上の位置を調査した過去の研究結果とおおよそ一致した (Hoham *et al.* 2002, 2006, Novis *et al.* 2008)。遺伝的な 2 グループの両方に直線型と S 字型の翼を持つ接合子が現れたことは、*C. nivalis* の種の実態を接合子の翼形状で識別することはできないことを意味している。

雪上藻のみで構成される *Chloromonas* サブクレード A 2 内には *C. nivalis*、*C. pichincae*、*C. hohamii*、*C. brevispina*、*C. tughillensis*、*C. chenangoensis*、*Chlainomonas kolii*、そして *Ci. rubra* が含まれる。そのうち 5 種 (*C. nivalis*、*C. pichincae*、*C. hohamii*、*C. brevispina*、*C. tughillensis*) は接合子の形態が知られており、それらは種ごとに特異的であり、*C. nivalis* の接合子と明瞭に識別できる。しかし、今回の分子系統解析の結果も Muramoto *et al.* (2008) と同様に、*C. nivalis* から接合子の形態で識別できない遺伝的に異なる 2 つのグループが存在することを明らかにした。そのうちの 1 つのグループは *C. nivalis* とは別種の雪上藻とクレードを形成した。この結果は接合子の形態だけでは *C. nivalis* を同定することはできず、これまで世界中から報告された *C. nivalis* の中には異なる種が混ざっている可能性が高いといえる。特に接合子の形態に基づく同定の場合は再調査が必要である。雪上藻として発見・同定される *C. nivalis* は接合子の状態でみつかることが多く、今後この藻を正確に同定するには、接合子ではなく、遊泳細胞の形態に基づく必要がある。それには接合子の休眠を解除し、発芽させて遊泳細胞を得る技術が必須であるが、まだその方法は確立されていない。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、実験手法について助言をいただいた横山亜紀子研究員をはじめ、研究室の方々に感謝いたします。また、快く研究機材を貸していただいた横山潤准教授と未公開の *C. pichincae* の *rbcl* 遺伝子配列データを提供してくださった村元京平氏 (東京大学大学院、理学研究科生物科学専攻) に感謝します。

引用文献

- Dopazo, J. 1994. Estimating errors and confidence intervals for branch lengths
In phylogenetic trees by a bootstrap approach. *J. Mol. Evol.* 38: 300-304.
- Fukushima, H. 1963. Studies on cryophytes in Japan. Yokohama Munic. Univ. Ser.
C. Nat. Sci. 43: 1-146.
- Hoham, R. W., Berman, J. D., Rojers, H. S., Felio, J. H., Ryba, J. B. and Miller,
P. R. 2006. Two new species of green snow algae from Upstate New York,
Chloromonas chenangoensis sp. nov. and *Chloromonas tughillensis* sp.
nov. (Volvocales, Chlorophyceae) and the effects of light on their life
cycle development. *Phycologia* 45: 319-330.
- , Bonone, T. A., Martin, C. W. and Leebens-Mack, J. H. 2002. A combined
18S rDNA and *rbcL* phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas*
(Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature
habitats. *J. Phycol.* 38: 1051-1064.
- Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M. and Watanabe, M. M. 2004. NIES-Collection.
List of Strains. Microalgae and Protozoa. 7th ed. National Institute for
Environmental Studies, Tsukuba, Japan, pp. 257.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base
Substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.
J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- Muramoto, K., Kato, S., Shitara, T., Hara, Y., and Nozaki, H. 2008.
Morphological and Genetic Variation in the Cosmopolitan Snow Alga
Chloromonas nivalis (Volvocales, Chlorophyta) from Japanese Mountainous
Area. *Cytologia* 73: 91-96
- Novis, P. M., Hoham, R. W., Beer, T and Dawson, M. 2008. Two snow species of the
quadriflagellate green alga *Chlainomonas* (Chlorophyta, Volvocales):
Ultrastructure and phylogenetic position within the *Chloromonas* clade.
J. Phycol. 44: 1001-1012.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for
reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Schlösser, U. G. 1994. SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of
Göttingen. Catalogue of strains. *Bot. Acta.* 107: 113-186.
- Sebastián, C. R and O'Ryan, C. 2001. Single-cell sequencing of dinoflagellate
(Dinophyceae) nuclear ribosomal genes. *Mol. Ecol. Notes* 1: 329-331.
- Starr, R. C. and Zeikus, J. A. 1993. UTEX: The culture collection of algae at
the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29: 1-106 (Suppl.).
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary
Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:

1596-1599.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

2. 研究実績

この章に掲載した論文は、いずれ学術雑誌に原著として発表される予定です。
特に引用を希望される方は、引用の可否について下記へお問い合わせ下さい。

問い合わせ先

名前：原 慶明

住所：990-8560 山形市小白川町1-4-12 山形大学理学部生物学科

電話：023-628-4610

Fax：023-628-4625

e-mail: hara@sci.kj.yamagata-u.ac.jp